



(19)

JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 2002284698 A
(43) Date of publication of application: 03.10.2002

(51) Int. Cl. A61K 45/00

A61K 31/711, A61K 35/76, A61K 38/00, A61K 39/395, A61K 48/00,
A61P 9/10
// C12N 15/09

(21) Application number: 2001085073

(22) Date of filing: 23.03.2001

(71) Applicant: EGASHIRA KENSUKE
DAI ICHI SEIYAKU CO LTD

(72) Inventor: EGASHIRA KENSUKE
TAKESHITA AKIRA

(54) PREVENTIVE AND/OR CURATIVE FOR
VASCULAR RESTENOSIS

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a preventive and/or a curative for vascular restenosis and a novel method for preventing and/or treating vascular restenosis, disease which results from percutaneous coronary intervention such as percutaneous transluminal coronary angioplasty(PTCA) or percutaneous intervention against peripheral arteriosclerosis, or the like.

SOLUTION: The preventive and/or curative for vascular restenosis contains, as an active ingredient, an inhibitor of monocyte chemoattractant protein(MCP-1). In the method for preventing and/or treating vascular restenosis, an expression vector(pcDNA3) carrying 7ND-MCP-1 gene is injected into the muscle of femoral region of a model animal (rat). It is confirmed that 7ND-MCP-1 is produced in the muscular cells where the vector plasmids have been introduced, and suppresses the restenosis of the reconstructed blood vessel.

COPYRIGHT: (C)2002,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-284698

(P2002-284698A)

(43) 公開日 平成14年10月3日 (2002. 10. 3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
31/711		31/711	4 C 0 8 4
35/76		35/76	4 C 0 8 5
38/00		39/395	D 4 C 0 8 6
39/395			N 4 C 0 8 7
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-85073 (P2001-85073)

(22) 出願日 平成13年3月23日 (2001. 3. 23)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年3月1日
社団法人日本循環器学会発行の「第65回日本循環器学
会・学術集会特集 第65巻 増刊」に発表

(71) 出願人 500242801

江頭 健輔

福岡県福岡市早良区百道浜3-5-2
101号

(71) 出願人 000002831

第一製薬株式会社

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

(72) 発明者 江頭 健輔

福岡県福岡市早良区百道浜3-5-2 ア
クアコート2番館101号

(74) 代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管再狭窄の予防及び／又は治療剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 経皮経管冠動脈拡張術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty; PTCA) 等の経皮的冠動脈インターベンション又は末梢血管動脈硬化に対する経皮的インターベンション等によって生じる、血管再狭窄の予防及び／又は治療剤、更には新たな血管再狭窄の予防及び／又は治療方法の提供。

【解決手段】 単球遊走因子-1 (MCP-1) 機能阻害剤を有効成分とする血管再狭窄の予防及び／又は治療剤。

【効果】 7ND-MCP-1 遺伝子を含む発現ベクター (pcDNA3) をモデル動物 (ラット) の大腿部に筋肉注射し、ベクタープラスミドが導入された筋肉細胞で産生される7ND-MCP-1 が血行再建術を施した血管の再狭窄を抑制することを確認した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単球遊走因子-1 (MCP-1) 機能阻害剤を有効成分とする血管再狭窄の予防及び／又は治療剤。

【請求項2】 MCP-1 機能阻害剤が、抗MCP-1 抗体、MCP-1 アンタゴニスト、MCP-1 ドミナントネガティブ及びそれらをコードする遺伝子から選ばれる1種又は2種以上のものである請求項1記載の予防及び／又は治療剤。

【請求項3】 MCP-1 ドミナントネガティブをコードする遺伝子が、配列番号1で表わされるものである請求項2記載の予防及び／又は治療剤。

【請求項4】 血管再狭窄が、経皮的冠動脈インターベンション又は末梢血管動脈硬化に対する経皮的インターベンションによって生じるものである請求項1～3のいずれか1項記載の予防及び／又は治療剤。

【請求項5】 単球遊走因子-1 (MCP-1) 機能阻害剤の有効量を投与することを特徴とする血管再狭窄の予防及び／又は治療方法。

【請求項6】 MCP-1 機能阻害剤が、抗MCP-1 抗体、MCP-1 アンタゴニスト、MCP-1 ドミナントネガティブ及びそれらをコードする遺伝子から選ばれる1種又は2種以上のものである請求項5記載の予防及び／又は治療方法。

【請求項7】 MCP-1 ドミナントネガティブをコードする遺伝子が配列番号1で表わされるものである請求項6記載の予防及び／又は治療方法。

【請求項8】 血管再狭窄が、経皮的冠動脈インターベンション又は末梢血管動脈硬化に対する経皮的インターベンションによって生じるものである請求項5～7のいずれか1項記載の予防及び／又は治療方法。

【請求項9】 遺伝子を生体の血行再建術施術部位以外の部位に投与するものである請求項7又は8記載の予防及び／又は治療方法。

【請求項10】 投与部位が筋肉である請求項9記載の予防及び／又は治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な血管再狭窄予防及び／又は治療剤、並びに血管再狭窄の予防及び／又は治療方法に関する。

【0002】

【従来の技術】バルーンカテーテルを用いた経皮的冠動脈形成術(percutaneous transluminal coronary angioplasty; PTCA)は、虚血性心疾患の積極的な治療法として確立され、本邦でも広く施行されている(受療者数約13万人、1999年)。しかし、バルーンカテーテルによる血管拡張は、血管外径の持続的収縮反応を引き起こし、また局所的な動脈ダメージにより、血管内皮細胞障害、炎症に伴う血液中炎症細胞の浸潤、血管平滑筋細

胞の内膜下への遊走と増殖を引き起こす。これが血管の病的リモデリングであり、病理的には血管内腔の再狭窄を生じる。再狭窄の発生率はPTCAで約30～40%の患者に起こることが知られており、PTCAの最大の問題点とされている。

【0003】近年、狭窄部をバルーンカテーテルで拡張した後、ステント(メッシュ状又はコイル状の金属製支持物)を留置する方法が開発され、再狭窄の発生率は軽減された。しかしながら、なお20～30%の患者において、治療後6ヶ月以内に再狭窄が起こることが報告されている。(N. Engl. J. Med., 331, P489, 1994)更に、直径2.8mm以下の冠動脈については、ステント処置でもPTCA処置と同等の再狭窄率を示している(Circulation, 102, 2593-2598, 2000)。更に、ステント内再狭窄部位拡張後の再々狭窄率は50%以上であり、深刻な問題となっている。

【0004】このように、血管の再狭窄は、狭窄又は閉塞した動脈を、当技術分野において血管形成術として知られている処置、すなわちレーザー及びバルーン血管形成術、アテレクトミー(atherectomy)及びステント内移植の後に起こる事象である。

【0005】これまでPTCA後の再狭窄予防の目的で、多くの臨床試験が行われてきた。その中で、最近では抗アレルギー薬であるtranilast(Circulation, 90, I-652, 1994, Circulation, 94, I-620, 1996)及び抗酸化剤のprobucol(N. Engl. J. Med., 337, 365-372, 1997)による再狭窄予防効果が多施設二重盲検試験で明らかにされているが、医薬品としての認可を獲得するまでには至っていない。GPIIb/IIIa拮抗薬、abciximabは、PTCA直後に起こる冠動脈の再閉塞による虚血イベント再発予防で適応を受けてはいるが、その効果としては十分満足されるものではない(JAMA, 278, 479-484, 1997)。

【0006】ところで、ケモカインは、白血球やリンパ球に対して、遊走活性を有する一群の蛋白質である。ケモカインは、その構造から大きく4種類に分けられ、1番目と2番目のシステインが連続して配置されているものは、CCケモカインと称されている。

【0007】CCケモカインのひとつである単球遊走因子-1(MCP-1)は、それ自身が蛋白として報告され、またほぼ同時期にcDNA配列も明らかになった(J. Exp. Med. 169, 1449-1459, 1989; J. Exp. Med. 169, 1485-1490, 1989; FEBS Lett, 244, 487-493, 1989)。

【0008】MCP-1を認識する受容体はすでに同定され、またcDNAもクローニングされている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 2752-2756, 1994; Biochem. Biophys. Res. Commun. 202, 1156-1162, 1994)。現在、CCケモカイン受容体として11種類の受容体が知られており、MCP-1受容体はCCR2と呼ばれて

10

20

30

40

50

いる。

【0009】ロリンズらは、MCP-1蛋白のアミノ酸変異体を各種作成し、そのうちいくつかは細胞遊走活性が消失することを報告した(J. Bio. Chem. 269, 15918-15924, 1994)。これらの変異体のうち、N末端から数えて2から8番目のアミノ酸を欠失させた変異体7ND-MCP-1は、CCR2に対する結合能はあるが、細胞遊走を惹起しない、又はドミナントネガティブ(dominant negative)として野生型MCP-1とダイマーを形成し、MCP-1の機能を阻害した。また、ケモカインのN末端欠失が、ケモカインの対応する内在性単量体とのヘテロ2量体を形成することによるケモカイン受容体の相互作用の有力なドミナントネガティブ阻害剤になり得、このものが関節リウマチ、炎症性腸疾患、多発性硬化症、肺繊維症などの慢性肺炎等の炎症、自己免疫疾患等の治療に有効であることが知られている(特表平11-506005号公報)。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、経皮冠動脈拡張術(percutaneous transluminal coronary angioplasty; PTCA)等の経皮的冠動脈インターベンション又は末梢血管動脈硬化に対する経皮的インターベンション等によって生じる、血管再狭窄の予防及び／又は治療剤、更には新たな血管再狭窄の予防及び／又は治療方法を提供することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、7ND-MCP-1遺伝子を含む発現ベクター(p cDNA3)をモデル動物(ラット)の大腿部に筋肉注射し、ベクタープラスミドが導入された筋肉細胞で産生される7ND-MCP-1が血行再建術を施した血管の再狭窄を抑制することを確認し、MCP-1機能阻害剤が血管再狭窄の予防及び／又は治療剤として有用であることを見出し、本発明を完成した。

【0012】すなわち、本発明はMCP-1機能阻害剤を有効成分とする血管再狭窄の予防及び／又は治療剤を提供するものである。更には、MCP-1機能阻害剤の有効量を投与することの特徴とする血管再狭窄の予防及び／又は治療方法に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明に係るMCP-1機能阻害剤は、生体におけるMCP-1の機能を阻害できるものであれば特に限定されるものではない。具体的には、抗MCP-1抗体(ポリクローナル及びモノクローナルを含む)、MCP-1アンタゴニスト(蛋白及び非蛋白低分子化合物を含む)、MCP-1ドミナントネガティブ(蛋白及び非蛋白低分子化合物を含む)及び、MCP-1機能を阻害するものが蛋白の場合は、それらをコードする遺伝子をも挙げることができる。これらの抗体、アンタゴニスト、ドミナントネガティブ及びこれらをコー

ドする遺伝子はすでに種々のものが知られており、また公知の手法により得ることが可能なものを本発明に用いることができる。

【0014】例えば、抗MCP-1抗体は、J. Immunol. 147, 2229-2233, 1991に記載の方法により得ることができ、MCP-1アンタゴニスト及びMCP-1ドミナントネガティブは、特表平11-506005号公報等で知られている。

【0015】本発明においては、蛋白としてのMCP-1機能阻害剤を生体へ投与するよりも、蛋白としてのMCP-1機能阻害剤をコードする遺伝子を導入する方が、遺伝子を生体(血)中で長く存在させることができるため好ましい。

【0016】本発明においては、MCP-1アンタゴニスト又はMCP-1ドミナントネガティブが好ましく、中でも7ND-MCP-1が好ましい。更には、MCP-1アンタゴニスト又はMCP-1ドミナントネガティブをコードする遺伝子が好ましく、中でも7ND-MCP-1をコードする遺伝子が好ましい。7ND-MCP-1をコードする遺伝子としては、配列表の配列番号1に示される塩基配列を有するDNAが用いられる。このDNAは、それ自体公知の遺伝子工学的手法によって作成することができる。すなわち、配列表の配列番号2で示される野生型MCP-1をコードするDNAの塩基配列より、合成プライマーを用いたPCR法を用いて作成すればよい。

【0017】遺伝子を生体内で発現させるために用いる発現ベクターとしては、その機能を発揮するものであれば特に限定されるものではなく、例えばp cDNA3、pEF-BOS、pXT1などのプラスミドベクターやアデノウイルス、センダイウイルスなどのレトロウイルスベクターを挙げることができる。また、発現ベクターを構築する際にはプロモーターやエンハンサーを用いてもよく、プロモーターやエンハンサーは、宿主(生体)内で機能するものであれば特に限定されるものではない。プロモーターとしては、例えばSV40プロモーター、CMVプロモーター、HSV-TK、SR α 、RSVなどを挙げることができる。

【0018】また、遺伝子を宿主(生体)内で発現させるためには、リボソームも用いることができる。この場合、遺伝子はリボソームの内部、またリボソームを構成する脂質二重膜の内部又は膜の外側に存在していてもよい。遺伝子を宿主(生体)内で発現させることが可能なリボソームの組成は、種々のものが知られている。

【0019】導入された7ND-MCP-1遺伝子より7ND-MCP-1蛋白が生産されていることの確認は、蛋白が血清中に存在するか否かをELISA法により検出すればよい。

【0020】本発明の医薬の適応対象となる血管再狭窄としては、経皮的冠動脈インターベンション及び末梢血

管動脈硬化に対する経皮的インターベンションによって生じる再狭窄が挙げられる。ここで、経皮的インターベンションには、PTCA、ステント、粥腫切除術、レーザー血管形成術のいずれも含まれる。

【0021】本発明の血管再狭窄の予防及び／又は治療剤の有効成分であるMCP-1機能阻害剤の生体への投与は、経口的又は非経口的に行えばよい。なお、MCP-1機能阻害剤が蛋白の場合は、非経口的に投与することが望ましい。非経口的投与の方法としては、注射によるものを挙げることができ、注射は血行再建術施術部位（血管）に行ってもよいし、動脈、静脈、筋肉、皮膚、皮下等の血行再建術施術部位以外の部位に行ってもよい。MCP-1機能阻害剤を注射するための製剤（剤形）としては、注射剤を挙げることができ、このものは公知の製剤化技術により製造することができる。注射剤を製造するに際しては、公知の製剤添加物を配合することができ、該添加剤としては、例えば、等張化剤、緩衝剤、保存剤、賦形剤、無痛化剤等を挙げることができる。なお、患者への投与量は、患者の症状、年齢、性別、体重等により適宜検討すればよいが、例えば、蛋白の場合は、0.1～1000mqを、遺伝子の場合は、0.01～100mqを、2～4週間に1回投与すればよい。

【0022】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0023】（1）7ND-MCP-1の構築と発現
7ND-MCP-1をコードするベクタープラスミドは、MCP-1をコードするp c DNA 3ベクタープラスミドを鋳型にして、組換えPCR法を用いて作成した。すべての変異は、両方向からのDNAシーケンス解析により確認した。得られた7ND-MCP-1をコードするPCR産物をp c DNA 3ベクタープラスミドのマルチクローニング部位に組込んだ後、大腸菌にトランスフォームし、キアゲン社プラスミドギガキットを用いてプラスミドDNAを精製した。

【0024】（2）バルーン傷害後再狭窄反応ウサギモデル

日本白色ウサギに高コレステロール食負荷を2週間行った後、右総頸動脈を露出し同外頸動脈よりフォガティバルーンカテーテルを挿入し、バルーン傷害モデルを作成した。手術の3日前、右大腿筋内に7ND-MCP-1遺伝子（0.5mq/kg+エレクトロポレーション法、n=8）あるいは、PBS（PBS+エレクトロポレーション法、n=7）を筋注した。手術4週間後に、頸部エコー（HP社5500、10MHzプローブ使用）を施行した。3日後、7日後、28日後に病理組織学的検索を行った。

【0025】結果：

1. マクロファージ浸潤の抑制効果：内膜・中膜のマクロファージ比率（RAM11陽性細胞数／全細胞数）は、7ND-MCP-1群（3日後、 $4 \pm 3\%$ 、 $12 \pm 5\%$ ）で、PBS群（3日後、 $40 \pm 10\%$ 、 $50 \pm 5\%$ ）と比較して有意に少なかった。

2. 新生内膜抑制効果：内膜面積は7ND-MCP-1群 $0.39 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ 、PBS群 $0.65 \pm 0.02 \text{ mm}^2$ であり、7ND-MCP-1群で有意に小さく内膜肥厚が抑制されていた。内膜／中膜比も7ND-MCP-1群で有意に小さかった（7ND-MCP-1群： 0.2 ± 0.2 、PBS群： 0.9 ± 0.2 ）。

3. 陰性リモデリング抑制効果：エコーでの血管内径は、7ND-MCP-1群 $2.1 \pm 0.1 \text{ mm}$ 、PBS群 $1.7 \pm 0.1 \text{ mm}$ であり、7ND-MCP-1群でPBS群に比し有意に広がった。

4. ブラック安定化作用：ブラック安定化スコア（（コラーゲン+平滑筋面積）／（脂質沈着+炎症細胞浸潤面積））は7ND-MCP-1群 0.9 ± 0.1 、PBS群 0.6 ± 0.1 であり、7ND-MCP-1群で有意に大きく、7ND-MCP-1群でブラック安定化が生じていることが明かとなった。

【0026】以上の結果より、7ND-MCP-1遺伝子導入によるMCP-1活性の抑制により、高コレステロール血症ウサギのバルーン傷害後血管狭窄モデルの内膜肥厚ならびに陰性リモデリングは著明に抑制され、狭窄が防止された。

【0027】（3）バルーン傷害後再狭窄反応カニクイサルモデル

従来、ウサギ・ラット・マウスなどを用いたバルーン傷害後再狭窄反応実験で有効性が示唆された薬物の多くは、臨床で用いた場合は無効であった（例、ACE阻害薬）。したがって、上記ウサギでの実験研究成果を臨床研究に結びつけるためには、ヒトに近い霊長類（サル）での研究が望ましい。そこでカニクイサルを用いてバルーン傷害後再狭窄反応に対する7ND-MCP-1遺伝子治療の効果を検討した。

【0028】カニクイサルに高コレステロール食負荷を6～8週間行った後、右総頸動脈を露出し同外頸動脈よりヒトPTCA用バルーンカテーテルを挿入し右頸動脈バルーン傷害モデルを作成した。手術の3日前ならびに手術直後、右大腿筋内に7ND-MCP-1遺伝子（一回あたり 0.25 mq/kg 投与、計 0.5 mq/kg 投与、n=5）あるいは、PBS（n=5）を筋注した。7ND-MCP-1遺伝子筋注部位に3日前に局所麻酔剤、塩酸ピバカイン前処置を行った。手術4週間後に、病理組織学的検索を行った。

【0029】結果：

1. 新生内膜抑制効果：内膜面積（7ND-MCP-1群 $0.70 \pm 0.15 \text{ mm}^2$ 、PBS群 $2.8 \pm 1.3 \text{ mm}^2$ ）及び内膜／中膜比（7ND-MCP-1群： 0.0

2±0.01、PBS群：0.3±0.1）は7ND-MCP-1群で有意に小さかった。

2. マクロファージ浸潤の抑制効果：内膜・中膜のマクロファージ比率は、7ND-MCP-1群（12±5%）で、PBS群（43±10%）と比較して有意に少なかった。

【0030】以上の結果より、7ND-MCP-1遺伝子導入によりバルーン傷害後の内膜肥厚が抑制されることが霊長類で実証された。これらの実施例により、7ND-MCP-1遺伝子導入による抗MCP-1遺伝子治*10

*療がヒト血管形成術後再狭窄の新たな遺伝子治療法となりうる事が判明した。

【0031】

【発明の効果】MCP-1機能阻害剤は、経皮的冠動脈インターベンション（PTCA、ステント、粥腫切除術、レーザー血管形成術）、及び末梢血管動脈硬化に対する経皮的インターベンションによって生じる、再狭窄の予防及び／又は治療剤として有用である。

【0032】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> EGASHIRA KENSUKE

DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD

<120> Preventing and/or therapeutic agent for vascular restenosis

<130> P01171303

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 279

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgaaagtct ctgccgccct tctgtgcctg ctgctcatag cagccacctt cattccccaa 60
gggtctgctc aggtcacctg ctgttataac ttcaccaata ggaagatctc agtgcagagg 120
ctcgcgagct atagaagaat caccagcagc aagtgtccca aagaagctgt gatcttcaa 180
accattgttg ccaaggagat ctgtgctgac cccaagcaga agtgggttca ggattccatg 240
gaccacctgg acaagcaaac ccaactccg aagacttga 279

<210> 2

<211> 300

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Yoshimura, T.

Yuhki, N.

Moore, S.K.

Appella, E.

Lerman, M.I.

Leonard, E.J.

<302> Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): full length DNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE.

<303> FEBS Lett.

<304> 244

<305> 2

<306> 487-493

<307> 1989-02

<400> 2

9

10

atgaaaagtct ctgccqccct tctgtqcctg ctgctcatag caqccacctt cattcccca 60
 qggctcgcgc aqccagatgc aatcaatgcc ccagtcacct gctgttataa cttcaccaat 120
 aqgaagatct cagtgcagag gctcgcgagc tatagaagaa tcaccagcag caagtgtccc 180
 aaagaagctg tgatcttcaa gaccattgtg qccaaggaga tctgtgctga cccaagcag 240
 aaqtqqgttc aqqattccat qgaccacctg qacaagcaaa cccaaactcc qaaqacttga 300

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K 48/00	
	48/00	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P	9/10		1 0 1
	1 0 1	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 N	15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
	Z N A		

(72)発明者 竹下 彰
 福岡県大野城市平野台2丁目19番15号

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA80 DA02 GA12 GA13
 HA17
 4C084 AA02 AA13 AA17 CA53 DC50
 MA66 NA14 ZA402 ZA452
 4C085 AA13 DD62
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04
 MA66 NA14 ZA40 ZA45
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66
 NA14 ZA40 ZA45